Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 4, Oct- Nov 2017, p. 584-593

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 4، مهر - آبان 1396، ص. 593-584

ارزیابی خواص فیزیکی و ضدمیکروبی فیلم خوراکی کیتوزان حاوی اسانس صمغ بنه

وحید علی‌زاده[1]- حسن برزگر[2*]- بهزاد ناصحی[3]- وحید سمواتی[2]

تاریخ دریافت: 1394/07/21
تاریخ پذیرش: 1394/11/24

چکیده

استفاده از فیلم‌های ضدمیکروب روشی موثر برای کنترل عوامل بیماری‌زا و بهبود کیفیت مواد غذایی است. در این تحقیق، فیلم‌های خوراکی کیتوزان حاوی اسانس صمغ بنه واریته کردیکا در غلظت‌های 0، 0/5، 1 و 2 درصد (حجمی/ حجمی)، تولید شده و خواص فیزیکی، مکانیکی و ضدمیکروبی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در غلظت 2 درصد اسانس فیلم‌های کیتوزان، کمترین میزان استحکام‌کششی (13/23 مگاپاسکال) و حلالیت در آب (16/15 درصد) و بیشترین میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب ($1/73\times10^{-10}$ g/m.s.Pa)، تغییرات کلی رنگ (26/75) و کرنش تا نقطه پاره شدن (59/37 درصد) را نشان دادند. اثر مهارکنندگی فیلم‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیش از باکتری‌های گرم منفی بود. در میان باکتری‌های مورد مطالعه، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس صمغ بنه بودند. همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی موید نتایج به‌دست آمده در این تحقیق بودند. نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس صمغ بنه به‌عنوان یک ماده ضدمیکروب طبیعی، پتانسیل بالایی برای تولید فیلم‌های ضدمیکروب دارد.

واژه‌های کلیدی: کیتوزان، اسانس صمغ بنه، فعالیت ضدمیکروبی، فیلم خوراکی

مقدمه

افزایش رو به رشد ضایعات مواد پلاستیکی و همچنین بازیافت مشکل اکثر این مواد، صنایع غذایی و بسته‌بندی را به توسعه مواد بسته‌بندی زیست‌تخریب‌پذیر[3]، ترغیب نموده است (Tharanathan, 2003). در سال‌های اخیر، فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به دلیل داشتن مزایایی از جمله تجدیدپذیر بودن و سازگاری با محیط زیست[4]، مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند (Salmieri & Lacroix, 2006). بسته‌بندی‌های زیست‌سازگار بر پایه فیلم‌های خوراکی[5]، عمدتا از پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و چربی‌ها ساخته می‌شوند. از بین پلی‌ساکاریدها، کیتوزان به دلیل توانایی تشکیل فیلم و خصوصیات عالی مکانیکی، فیزیکی و ضدمیکروبی، منشاء تحقیقات بسیاری در صنعت غذا بوده است (Peng & Li, 2014). کیتوزان یک پلی ساکارید خطی است که از استیل‌زدایی کیتین به دست می‌آید و پس از سلولز فراوانترین پلی‌ساکارید موجود در طبیعت می‌باشد (Aider, 2010). کیتوزان به دلیل وجود گروه‌های آمینی با بار مثبت دارای فعالیت ضدمیکروبی می‌باشد. این گروه‌های آمینی با غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها که دارای بار منفی است واکنش می‌دهند و به دنبال آن نشت اجزاء پروتئینی و درون‌سلولی میکروارگانیسم اتفاق می‌افتد (Dutta و همکاران، 2009). قابلیت فیلم‌های تجدیدپذیر به عنوان حامل ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و سایر عوامل فعال[6] به منظور کنترل عوامل بیماری‌زا، بهبود کیفیت و افزایش مدت‌ماندگاری مواد غذایی کاربردهای بسیاری را برای آن‌ها در صنایع بسته‌بندی مهیا نموده است (Cha و همکاران، 2002). از سوی دیگر بیماری‌های ایجاد شده توسط میکروارگانیسم‌ها در زنجیره‌های عرضه موادغذایی، تهدیدی جدی برای سلامت عموم مردم به حساب می‌آید (De Moura و همکاران، 2012).

از این رو در دهه‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای در زمینه‌ی استفاده از بسته‌بندی‌های فعال صورت گرفته است. مهمترین ترکیباتی که در تولید بسته‌بندی‌های فعال استفاده می‌شوند شامل جاذب‌های اکسیژن، دی‌اکسید کربن، رطوبت، عوامل آزادکننده اتانل و مواد ضدمیکروب می‌باشد (Coma، 2008). مواد ضدمیکروب طبیعی که به‌صورت گسترده در بسته‌بندی‌های فعال استفاده

1، 2 و 3- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، استادیار و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان.
(* - نویسنده مسئول: Email: barzegarha@yahoo.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.50541

3 Biodegradable
4 Biocompatible
5 Edible film
6 Active agent

می‌شوند شامل آنزیم‌های ضدمیکروب، باکتریوسین‌ها، اسانس‌ها و ترکیبات فنولی می‌باشند. استفاده از اسانس‌ها به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروب طبیعی در مقابل طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌ها توجه زیادی را در صنایع غذایی به خود معطوف نموده است (Burt، 2004).

بنه (*Pistacia atlantica*) درختی از گونه درختان خانواده آنکاردیاسه[1] است. در ایران سه واریته کابولیکا[2]، موتیکا[3] و کردیکا[4] برای بنه شناسایی شده است که در مجموع یک میلیون و دویست هزار هکتار از جنگل‌های شرق، غرب و مرکز ایران توسط دو واریته موتیکا و کردیکا پوشیده شده است (Hatamnia و همکاران، 2014). اسانس صمغ (رزین) درخت بنه فعالیت ضدقارچی و ضدمیکروبی خوبی را از خود نشان داده است (Hosseini و همکاران، 2013). اثر ضدمیکروبی اسانس صمغ بنه بدلیل وجود دو ترکیب آلفاپینن[5] و بتاپینن[6] می‌باشد (Barrero و همکاران، 2005). مطالعات گوناگون نشان داده‌اند که افزودن اسانس‌ها به فیلم کیتوزان باعث بهبود ویژگی‌های فیزیکی و ضدمیکروبی فیلم‌های حاصل می‌شود. در یکی از پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه، Ojagh و همکاران (2010) نشان دادند که استفاده از اسانس دارچین در فیلم کیتوزان باعث بهبود فعالیت ضدمیکروبی و همچنین بهبود برخی ویژگی‌های فیزیکی فیلم کیتوزان می‌گردد. در پژوهشی دیگر، Sánchez-González و همکاران (2010) نیز گزارش کردند که افزودن اسانس ترنج به فیلم‌های بر پایه کیتوزان، اثر ضدمیکروبی و ضدقارچی فیلم‌های حاصله را بهبود می‌دهد. با توجه به بررسی منابع انجام شده، تاکنون پژوهشی در مورد تاثیر اسانس صمغ بنه بر خصوصیات فیلم‌های خوراکی صورت نگرفته است. از این رو، هدف از پژوهش حاضر، بررسی ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی، ضدمیکروبی و ریزساختار فیلم‌های خوراکی بر پایه‌ی کیتوزان حاوی اسانس صمغ بنه بود.

مواد و روش‌ها

مواد

کیتوزان با درجه استیل‌زدایی[7] 85-75 درصد از شرکت سیگما و صمغ درخت بنه از شرکت سقزسازی کردستان تهیه شدند. اسید استیک، گلیسرول، توئین 80، سدیم کلرید و کلسیم کلرید از شرکت مرک آلمان خریداری گردید. باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* بودند و همگی از دانشکده علوم‌دامی و صنایع غذایی دانشگاه منابع طبیعی و کشاورزی رامین خوزستان تهیه گردیدند. محیط کشت‌های مولر هینتون براث[8] و مولر هینتون آگار[9] نیز از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

تهیه‌ی اسانس صمغ بنه

جهت استخراج اسانس صمغ بنه از روش تقطیر با آب و دستگاه اسانس‌گیری کلونجر استفاده گردید. برای این کار 100 گرم از صمغ بنه به بالن کلونجر منتقل شد و 800 میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. عملیات اسانس‌گیری 3 ساعت ادامه یافت. سپس اسانس به شیشه تیره منتقل و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تهیه فیلم

محلول کیتوزان 2 درصد (وزنی/ حجمی)، با انحلال 2 گرم پودر کیتوزان در 100 میلی‌لیتر محلول اسید استیک 1 درصد (حجمی/ حجمی) در دمای 90 °C و با سرعت 1200 دور در دقیقه تهیه گردید. پس از 20 دقیقه کیتوزان در استیک اسید به‌طور کامل حل شد. در این مرحله گلیسرول به‌عنوان نرم‌کننده (به میزان 30 درصد وزن کیتوزان) به محلول اضافه شد و هم‌زدن در دمای 60°C به مدت 20 دقیقه ادامه یافت. در مرحله بعد، توئین 80 به میزان 0/2 درصد (حجمی/ حجمی) از اسانس، به‌عنوان امولسیفایر، به محلول اضافه گردید و سپس به مدت 30 دقیقه در دمای 40 °C عمل همزدن آرام صورت گرفت تا امولسیفایر به‌طور یکنواخت درون محلول پخش شود. سرانجام اسانس صمغ بنه در سه سطح غلظتی 0/5، 1 و 2 درصد به محلول کیتوزان اضافه شد. سپس محلول با 13500 دور در دقیقه به مدت دو دقیقه با استفاده از دستگاه هموژنایزر التراتوراکس، به‌هم زده شد. به‌منظور خروج حباب‌های هوا محلول حاصل به کمک پمپ خلا هواگیری گردید. در ادامه، محلول تشکیل‌دهنده فیلم بر روی ظروف پلکسی‌گلاس ریخته و در دمای محیط به مدت 72 ساعت خشک شد و فیلم‌ها پس از خشک شدن از سطح ظرف جداسازی شدند. قبل از انجام آزمایش‌های مربوطه، فیلم‌ها داخل دسیکاتور حاوی محلول اشباع نیترات منیزیم (رطوبت نسبی 53 درصد) به مدت 72 ساعت نگهداری شدند (Abdollahi و همکاران، 2012).

---

1 Anacardiaceae
2 Cabulica
3 Mutica
4 Kurdica
5 α-pinene
6 β-pinene
7 Degree of Deacetylation
8 Mueller–Hinton Broth
9 Mueller–Hinton agar

ریزساختار

بررسی ریزساختار نمونه‌های فیلم بوسیله یک میکروسکوپ الکترونی اسکنی[1] (KYKY–EM3200، چین) صورت پذیرفت. به‌منظور بررسی تاثیر افزودن اسانس بنه بر روی ریزساختار نمونه‌های فیلم تولید شده، تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح و سطح‌مقطع فیلمها تهیه گردید. قبل از تصویربرداری، فیلمها با لایه‌ای از طلا پوشانده شدند. تصویربرداری از نمونه‌ها با شتاب ولتاژ 20 کیلووات و در بزرگنمائی‌های مختلف صورت گرفت.

اندازه‌گیری ضخامت

برای تعیین ضخامت نمونه‌ها از میکرومتر دیجیتال با دقت نزدیک به 0/01 میلی‌متر در حداقل 10 نقطه تصادفی هر فیلم استفاده شد. میانگین ضخامت محاسبه شده و در تعیین خواص مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب استفاده گردید.

اندازه‌گیری حلالیت در آب

ابتدا تکه‌های فیلم (با ابعاد 4× 1 سانتی‌متر مربع) در آون با دمای 105 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت به‌منظور رسیدن به یک وزن ثابت قرار گرفتند. پس از آن فیلم‌های خشک شده در 50 میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور و در حالی که به‌صورت مقطعی هم‌زده می‌شد، در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 6 ساعت قرار گرفتند. در نهایت تکه‌های فیلم را به‌وسیله کاغذ صافی از آب جدا کرده و پس از خشک کردن در دمای 105 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت، توزین شدند. درصد حلالیت فیلم‌ها از رابطه 1 محاسبه گردید (Zolfi و همکاران، 2014).

() 100× (وزن خشک اولیه/ (وزن خشک نهایی- وزن خشک اولیه))= درصد حلالیت

آزمون نفوذپذیری نسبت به بخار آب

سرعت انتقال بخار آب مطابق روش ASTM E96-95 اندازه‌گیری شد. برای این کار از فنجانک‌های مخصوصی با قطر داخلی 3 cm و ارتفاع 3/5 cm استفاده گردید. ابتدا درون ظروف شیشه‌ای کلرید کلسیم بدون آب ریخته شد و سپس سطح فنجانک‌ها به‌وسیله فیلم و با استفاده از گریس و گیره فلزی پوشانده شد. فنجانک‌ها درون دسیکاتور حاوی محلول اشباع کلرید سدیم قرار گرفتند. محلول اشباع کلرید سدیم در دمای 25 درجه سانتی‌گراد رطوبت 75 درصد ایجاد می‌کند. اختلاف رطوبت در دو سمت فیلم در دمای 25 درجه سانتی‌گراد فشار بخاری معادل 1753/55 پاسکال ایجاد می‌کند. تغییرات وزن فنجانک‌ها در طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتال با دقت 0/0001 گرم اندازه‌گیری شد. با رسم منحنی تغییرات وزن نسبت به زمان، یک خط راست بر حسب ($R^2>0/99$) حاصل شد. سرعت انتقال بخار آب[2](WVPR) از تقسیم تقسیم شیب خط رسم شده بر سطح فیلم که در معرض انتقال بخار آب قرار داشت، به‌دست آمد. نفوذپذیری به بخار آب (g/m.s.pa) از رابطه 2 محاسبه گردید.

$$WVP = \frac{WVTR \times X}{\Delta P} \qquad (2)$$

در این معادله ΔP: اختلاف فشار جزئی بین درون و بیرون فنجانک (پاسکال)، X: ضخامت فیلم (متر) است.

اندازه‌گیری خواص مکانیکی

مقاومت‌کششی[3] و کرنش تا نقطه شکست[4] با استفاده از دستگاه سنجش بافت (Stable Micro System[5]، مدل TA.XT.PLUS، انگلستان) و طبق استاندارد ASTM D882-02 اندازه‌گیری شد. ابتدا نمونه‌های فیلم به مدت 72 ساعت در رطوبت نسبی 53 درصد که توسط محلول اشباع نیترات منیزیم ایجاد شده بود قرار گرفتند. سپس، نمونه‌های فیلم با ابعاد 6×1 سانتی‌متر مربع بریده شد و در بین دو فک دستگاه قرار گرفتند. فاصله اولیه بین دو فک دستگاه 40 میلی‌متر و سرعت حرکت فک بالایی 50 میلی‌متر بر دقیقه بود. مقاومت‌کششی و کرنش تا نقطه شکست (میزان افزایش طول تقسیم بر طول اولیه ضرب در 100) از روی منحنی‌های نیرو/ تغییر شکل به‌دست آمدند. مقاومت‌کششی فیلم‌ها از رابطه 3 محاسبه گردید.

(3) (ضخامت فیلم × عرض فیلم/ حداکثر نیرو در لحظه پاره شدن) = مقاومت‌کششی

اندازه‌گیری رنگ

اندازه‌گیری پارامترهای رنگی با استفاده از رنگ‌سنج[6] سری CR-400، ساخت ژاپن انجام گرفت. شاخص L^*: روشنایی نمونه (0 = سیاه و 100 =سفید)، شاخص a^*: قرمزی نمونه (60- =سبز و 60+ = قرمز) و شاخص b^*: زردی نمونه (60- =آبی و 60+ =زردی) در سه تکرار صورت گرفت. اختلاف رنگ کل (ΔE) و شاخص سفیدی (WI) نیز طبق روش Abdollahi و همکاران (2012) محاسبه شدند (معادله‌های 4 و 5).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L*)^2 + (\Delta a*)^2 + (\Delta b*)^2} \qquad (4)$$

1 Scanning Electron Microscopy

2 Water Vapor Transmission Rate (WVTR)

3 Tensile Strength

4 Strain to Break

5 Texture Analyzer

6 Chroma meter

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L*)^2 + a*^2 + b*^2} \qquad (5)$$

بررسی فعالیت ضدمیکروبی

برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها از روش انتشار آگار[1] استفاده شد. نمونه‌های فیلم با استفاده از یک قالب به دیسک‌هایی به قطر 10 میلی‌متر تبدیل شدند. قبل از قرار دادن دیسک‌ها روی سطح محیط کشت، عمل کشت سطحی با استفاده از 100 میکرولیتر محیط کشت مایع محتوای تقریبا 10^8 CFU/mL از هر کدام از باکتری‌های مورد آزمایش صورت گرفت. دیسک‌ها در شرایط کاملا استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار قرار گرفتند و در ادامه به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. اختلاف قطر هاله‌های تشکیل شده از قطر دیسک‌ها به‌عنوان شاخص فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها در نظر گرفته شد. در مواردی که هاله‌ای تشکیل نشده بود یعنی فعالیت ضدمیکروبی وجود نداشت، اختلاف مساحت برابر صفر در نظر گرفته شد. برای اطمینان از رشد یکنواخت باکتری‌ها بر سطح پلیت برای هر کدام از باکتری‌های مورد آزمایش یک پلیت کشت داده شده فاقد فیلم، در نظر گرفته شد. همچنین برای اطمینان از عدم آلودگی محیط‌های کشت از یک پلیت فاقد باکتری استفاده گردید (Dashipour و همکاران، 2015).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

همه آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شدند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Version 8.2, SAS institute Inc., Cary, NC) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام شد.

نتایج و بحث

مطالعه ریزساختار (مورفولوژی)

مطالعه ریزساختار ماتریس فیلم به درک بهتر مکانیسم انتقال بخار آب، ویژگی‌های مکانیکی و نوری آن کمک می‌کند. در شکل 1 تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح و سطح مقطع فیلم‌های کیتوزان نشان داده شده است. فیلم کیتوزان خالص دارای ریزساختار پیوسته، صاف و فشرده‌ای می‌باشد که نشان‌دهنده تشکیل یک ماتریس منظم است. افزودن اسانس منجر به افزایش زبری و کاهش پیوستگی فیلم‌های کیتوزان شده است که این اثر می‌تواند به ساختار بیرون‌زده فیلم، همانطور که بوسیله افزایش ضخامت فیلم‌ها نشان داده شده است و همچنین آرایش و قرار گرفتن ملکول‌های بسپار در طول تشکیل فیلم که ممکن است به‌صورت‌های مختلف شکل گیرد، نسبت داده شود (Ahmad و همکاران، 2012). فیلم حاوی 2 درصد اسانس دارای بافت نرم و ساختاری اسفنج‌مانند می‌باشد که حفره و سوراخ در سراسر سطح مقطع فیلم مشهود است. وجود حفره و تخلخل در مقطع عرضی فیلم در ارتباط با فراریت اسانس می‌باشد. در حقیقت این حفره‌ها، فضاهای پر شده توسط اسانس هستند که در طول خشک کردن فیلم از سطح فیلم تبخیر شده است. افزودن اسانس به بستر فیلم سبب تشکیل یک ساختار ناهمگن شده است که در آن قطره‌های اسانس در شبکه پیوسته پلی‌ساکاریدی قرار گرفته‌اند (Jouki و همکاران، 2014). این ساختار نفوذپذیری به بخار آب بالا و استحکام‌کششی پایین فیلم حاوی 2 درصد اسانس نسبت به فیلم شاهد را توجیه می‌کند. Sánchez-González و همکاران (2009) در مورد فیلم هیدروکسی‌پروپیل‌متیل‌سلولز حاوی اسانس درخت چای نتایج مشابهی مشاهده نمودند.

ضخامت

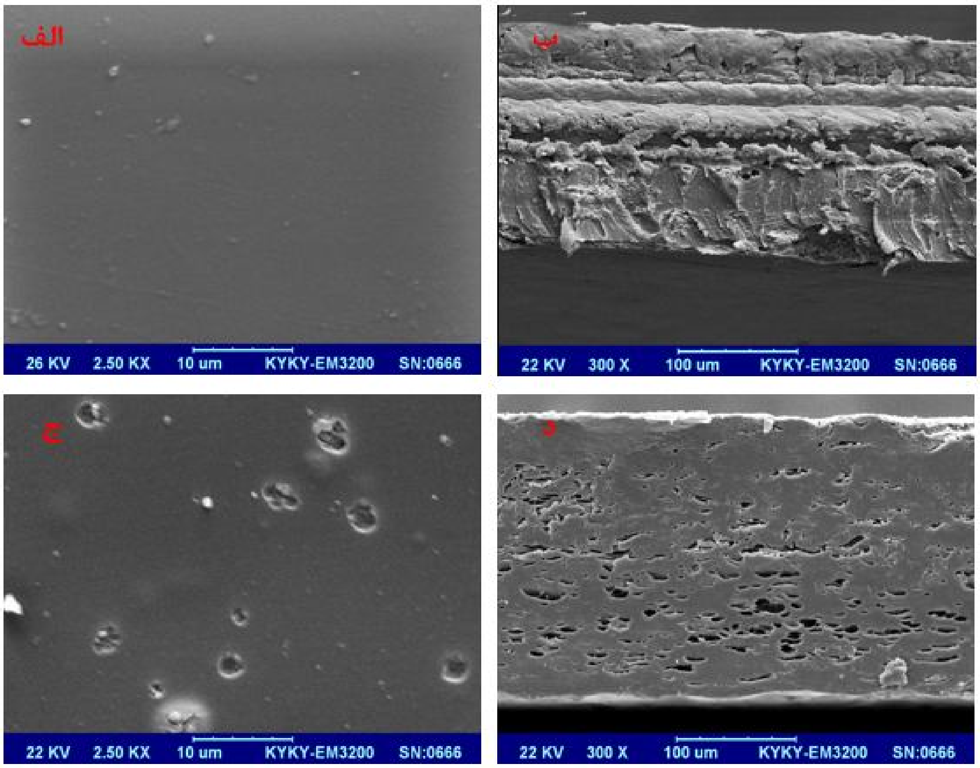
تاثیر افزودن اسانس بنه بر ضخامت فیلم‌های کیتوزان در جدول 1 نشان داده شده است. افزودن اسانس بنه سبب افزایش معنی‌داری در ضخامت فیلم‌ها نسبت به فیلم شاهد شد. ضخامت فیلم‌ها در دامنه 0/131 تا 0/185 میلی‌متر قرار داشتند. با افزایش مقدار اسانس، ضخامت فیلم‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که این افزایش ضخامت را می‌توان به محبوس شدن ریزقطره‌های اسانس در فیلم کیتوزان نسبت داد که منجر به تشکیل فیلم با ماتریس نرم و ساختار بیرون‌زده می‌شود و متعاقب آن ضخامت فیلم‌های تولید شده افزایش پیدا می‌کند (Dashipour و همکاران، 2015 و Ahmad و همکاران، 2012). نتایج حاصل از تحقیق Shojaee-Aliabadi وهمکاران (2013) بر فیلم کاپا-کاراگینان حاوی اسانس مرزه با نتایج این تحقیق همخوانی داشت

درصد حلالیت

در جدول 1 درصد حلالیت فیلم‌های تولید شده نشان داده شده است. فیلم شاهد کیتوزان حلالیت کمی در آب (کمتر از 23 درصد) داشت. نتایج مشابهی برای حلالیت در آب فیلم‌های کیتوزان توسط Garcí a و همکاران (2004) گزارش شده است. با افزایش مقدار اسانس حلالیت به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. افزودن اسانس بنه در سطوح 1 و 2 درصد منجر به کاهش حلالیت در آب فیلم‌های کیتوزانی به ترتیب به میزان 18 درصد و 28 درصد شد. این پدیده ناشی از پیوندهای عرضی تشکیل شده بین ترکیبات اسانس با گروه‌های آمیدی و استری کیتوزان بود (Ojagh و همکاران، 2010).

1 Agar Diffusion Method

ایجاد اتصالات سراسری در فیلم کیتوزان، منجر به کاهش گـرایش فیلم کیتوزان به آب شده و فیلمی بـا حلالیـت کمتـر در آب تولیـد می‌شود. نتایج مشابهی توسـط Abdollahi و همکـاران (2012) در مورد فیلم‌های کیتوزان/ رس حاوی اسانس رزمـاری مشـاهده شـد. نتایج حاصل از پژوهش Atef و همکـاران (2015) هـم دلالـت بـر کاهش حلالیت در آب فیلم‌های نانوکامپوزیت آگار با افزودن اسانس مرزه دارد که دلیل آن را ماهیت آبگریز اسـانس و بـرهمکنش بـین ترکیبات اسانس و گروه‌های هیدروکسیل بسیار نسبت دادند.



شکل 1- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح و مقطع عرضی فیلم‌های کیتوزان (الف) و (ب) فیلم شاهد، (ج) و (د) فیلم حاوی 2 درصد اسانس صمغ بنه

جدول 1- داده‌های حاصل از اندازه‌گیری خواص فیزیکی فیلم کیتوزان حاوی اسانس صمغ بنه

میزان اسانس (٪)	ضخامت (mm)	حلالیت در آب (%)	نفوذپذیری به بخار آب (g/msPa×10⁻¹⁰)	میزان کشش (%)	مقاومت کششی (MPa)
0	0/131 ±0/01[d]	22/46±0/73 [a]	1/04 ±0/05[c]	49/05±1/63[c]	21/22±1/97[a]
0/5	0/153 ±0/01[c]	21/19 ±1/22[a]	1/12 ±0/06[c]	50/36±2/98[c]	20/09±1/40[a]
1	0/167±0/01[b]	18/47 ±0/53[b]	1/35 ±0/09[b]	55/25±2/95[b]	17/04±1/26[b]
2	0/185±0/01[a]	16/15±0/54[c]	1/73 ±0/09[a]	59/37±2/49[a]	13/23±1/35[c]

*: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد در آزمون دانکن است.

نفوذپذیری به بخار آب (WVP)

نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های کیتوزان حـاوی غلظـت‌هـای مختلف اسانس بنه در جدول 1 نشان داده شده است. WVP بـرای فیلم کیتوزان شـاهد $1/04 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa بـود و بـا افـزایش غلظت اسانس، WVP فیلم‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. با افزایش محتوای اسانس بـه 2 درصـد، WVP از $10^{-10}\times 1/04$ بـه $1/73 \times 10^{-10}$g/m.s.Pa افزایش یافت. اگرچه افـزودن اسـانس بـه بستر فیلم باعث افزایش آبگریزی فیلم می‌شود، اما وجود اسانس در فیلم باعث افزایش عبور بخار آب شد. این اثر می‌توانـد بـه کـاهش پیوستگی بستر پلیمـر در حضـور اسـانس نسـبت داده شـود. نتـایج

مشابهی توسط Bonilla و همکاران (2012) در مورد فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس‌های آویشن و ریحان مشاهده شد. Jouki و همکاران (2014) هم نتایج مشابهی در مورد فیلم‌های موسیلاژ دانه به محتوای اسانس پونه کوهی به‌دست آوردند. آن‌ها گزارش کردند که WVP از $7/62 \times 10^{-11}$ g/m.s.Pa در فیلم شاهد به $17/56 \times 10^{-11}$ در فیلم حاوی 2 درصد اسانس پونه کوهی افزایش یافت.

خواص مکانیکی

در جدول 1 نتایج مقاومت‌کششی و درصد کرنش در نقطه شکست فیلم‌های کیتوزان مشاهده می‌شود. مقاومت‌کششی فیلم شاهد کیتوزان 21/22 مگاپاسکال بود. مقاومت‌کششی فیلم‌های حاوی اسانس نسبت به فیلم کیتوزان خالص ضعیف‌تر بود بطوریکه کمترین میزان مقاومت‌کششی در فیلم کیتوزان حاوی 2 درصد اسانس بنه به میزان 13/23 مگاپاسکال مشاهده شد. این یافته‌ها منطبق با نتایج Shen و Kamdem (2015) هنگام افزودن اسانس به محلول تشکیل‌دهنده فیلم کیتوزان بود. این امر را می‌توان به جایگزینی جزئی پیوندهای قوی پلیمر/ پلیمر کیتوزان با پیوندهای ضعیف پلیمر/ روغن در شبکه فیلم در حضور اسانس نسبت داد که ممکن است پیوستگی شبکه پلیمر را کاهش دهد و به دنبال آن کاهش مقاومت‌کششی فیلم‌ها صورت گیرد (Shojaee-Aliabadi و همکاران، 2013). در مقابل، با افزایش مقدار اسانس بنه از 0 تا 2 درصد، مقادیر درصد کرنش در نقطه شکست از 49/05 تا 59/37 افزایش یافت. این پدیده را می‌توان به اثر پلاستی‌سایزری اسانس بنه نسبت داد که باعث افزایش کشش‌پذیری فیلم می‌شود. Hosseini و همکاران (2015) هم با افزودن اسانس پونه کوهی به فیلم‌های بر پایه کیتوزان و ژلاتین مشاهده کردند که درصد ازدیاد طول با افزایش محتوای اسانس افزایش می‌یابد.

رنگ‌سنجی

تاثیر افزودن اسانس بنه بر روی پارامترهای رنگی (L^*, a^*, b^*)، اختلاف رنگ کل (ΔE) و شاخص شفافیت(WI) در جدول 2 نشان داده شده است. فیلم‌های بدون اسانس، روشنتر (میزان L^* بالاتر) بودند. با افزایش غلظت اسانس از صفر به 2 درصد، میزان L^* فیلم‌ها از 87/05 تا 79/22 کاهش یافت، همچنین پارامتر a^* از 1/88- تا 4/43- کاهش یافت اما پارامتر b^* از 7/28 تا 24/04 افزایش یافت. ΔE، که نشان‌دهنده درجه اختلاف رنگ کل با پلیت رنگی استاندارد می‌باشد، با افزودن اسانس به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. WI که درجه‌ی شفافیت فیلم را نشان می‌دهد با افزودن اسانس به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. فیلم‌های حاوی اسانس ظاهری متمایل به زرد داشتند که افزایش در مقادیر ΔE و b^* و کاهش مشاهده شده در مقادیر L^*، a^* و WI بیانگر این ظاهر زرد رنگ می‌باشد. این پدیده را می توان به ترکیبات فنولی موجود در اسانس نسبت داد که در طول موج‌های پایین توانایی جذب نور دارند (Shojaee-Aliabadi و همکاران، 2013). در تحقیقی که در آن از اسانس پونه کوهی در تهیه فیلم‌های خوراکی بر پایه موسیلاژ دانه به استفاده شده بود نتایج مشابهی بدست آمده است (Jouki و همکاران، 2014).

خواص ضدمیکروبی

اثر ضدمیکروبی کیتوزان به فاکتورهای زیادی از قبیل درجه دی استیلاسیون، وزن ملکولی، شرایط تشکیل فیلم، pH، دما و ... بستگی دارد. کیتوزان با درجه دی استیلاسیون بالا و وزن ملکولی پایین، فعالیت ضدمیکروبی بالایی دارد که دلیل آن افزایش حلالیت و افزایش چگالی بار مثبت است که منجر به تخریب غشای سلولی باکتری‌ها می‌شود. یکی از دلایل نداشتن اثر ضدمیکروبی کیتوزان در پژوهش حاضر شاید درجه دی استیلاسیون پایین کیتوزان باشد. همچنین ذکر این نکته ضروریست با وجود آنکه کیتوزان دارای اثر ضدمیکروبی است اما در برخی از پژوهش‌ها کیتوزان بدون هیچ افزودنی اثر ضد میکروبی از خود نشان نداده است (Ojagh و همکاران (2010) و Abdollahi و همکاران، 2012). فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس بنه در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و منفی در جدول 3 نشان داده شده است. فیلم کیتوزان خالص و فیلم حاوی 0/5 درصد اسانس بنه در مقابل تمام باکتری‌های مورد مطالعه اثر بازدارندگی نشان ندادند. فیلم کیتوزان حاوی 1 درصد اسانس بنه در برابر *اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* موثر نبود اما اثر بازدارندگی ضعیفی را بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* نشان داد. با افزایش غلظت اسانس، خاصیت ضدمیکروبی فیلم افزایش یافت. فیلم کیتوزان حاوی 2 درصد اسانس بنه علیه تمام باکتری‌های مورد آزمایش موثر بود و بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد

در بین باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش *استافیلوکوکوس اورئوس* با ناحیه بازداری 49/67 میلی‌متر مربع حساسترین و *سالمونلا تیفی‌موریوم* با ناحیه بازداری 12/48 میلی‌متر مربع مقاوم‌ترین میکروارگانیسم در برابر اسانس بنه بودند. فعالیت ضدمیکروبی اسانس صمغ بنه ناشی از وجود دو ترکیب آلفاپینن و بتاپینن می‌باشد (Barrero و همکاران، 2005). Ghalem و Mohamed(2009) گزارش کردند که اسانس صمغ بنه قابلیت مهار رشد به ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس پیوژنز* را دارد در حالی که بر *اشریشیاکلی* اثر چندانی ندارد.

جدول 2- پارامترهای مربوط به رنگ فیلم کیتوزان حاوی اسانس بنه

WI	ΔE	b*	a*	L*	میزان اسانس (٪)
85/02±0/42[a]	9/26±0/42[c]	7/28 ±0/38[c]	-1/88 ±0/08[a]	87/05±0/35[a]	0
80/38±3/33[b]	14/03±3/48[b]	12/46 ±3/68[b]	-3/24±0/64[b]	85/28 ±1/15[b]	0/5
70/40±0/85[c]	24/32±0/86[a]	22/27± 0/75[a]	-4/11±0/03[c]	81/01±0/46[c]	1
67/96±1/40[c]	26/75±1/42[a]	24/04 ±1/24[a]	-4/43±0/06[c]	79/22±0/74[d]	2

*: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد در آزمون دانکن است.

جدول 3- اثر ضدمیکروبی فیلم کیتوزان حاوی اسانس صمغ بنه

		ناحیه بازدارندگی (میلی‌متر مربع)		
سالمونلا تیفی‌موریوم	اشریشیاکلی	باسیلوس سرئوس	استافیلوکوکوس اورئوس	میزان اسانس (٪)
0/00[b]	0/00[b]	0/00[c]	0/00[c]	0
0/00[b]	0/00[b]	0/00[c]	0/00[c]	0/5
0/00[b]	0/00[b]	15/63 ±0/63[b]	22/58±1/76[b]	1
12/49±1/57[a]	21/12±1/87[a]	41/96±1/40[a]	49/67±3/02[a]	2

*: حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد در آزمون دانکن است.

اسانس‌ها معمولا در برابر باکتری‌های گرم مثبت موثرتر از باکتری‌های گرم منفی عمل می‌کنند (Ahmad و همکاران، 2012). این اثر ممکن است به دلیل وجود غشای خارجی (Outer Membrane) نسبتا غیرقابل نفوذی باشد که اطراف باکتری‌های گرم منفی را احاطه کرده است (Phillips & Fisher، 2006).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس صمغ بنه به‌عنوان یک ماده ضدمیکروب طبیعی می‌تواند در تولید فیلم‌های فعال مورد استفاده قرار گیرد. افزودن اسانس بنه به فیلم کیتوزان، مقاومت کششی، حلالیت در آب و شفافیت فیلم‌ها را به‌طور معنی‌داری کاهش داد اما درصد ازدیاد طول، نفوذپذیری به بخار آب افزایش پیدا کرد. فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها روی باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*) بیش از باکتری‌های گرم منفی (*اشریشیاکلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم*) بود. همچنین نتایج تصاویر میکروسکوپ الکترونی موید نتایج به‌دست آمده برای آزمون‌های مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌ها می‌باشد.

منابع

Abdollahi, M., Rezaei, M. & Farzi, G., 2012, A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan, *Journal of Food Engineering*, 111(2), 343-350.

Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T. & Agustini, T. W., 2012, Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils, *Food Hydrocolloids*, 28(1), 189-199.

Aider, M., 2010, Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review, LWT-*Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.

ASTM., 1995, Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-95, Annual book of ASTM, Philadelphia: *American Society for Testing and Materials*.

ASTM., 2002, Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, In Annual book of ASTM standards designation D882, Philadelphia, PA: *American Society for Testing and Materials*.

Atef, M., Rezaei, M., & Behrooz, R., 2015, Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil, *Food Hydrocolloids*, 45, 150-157.

Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, J. F., Akssira, M., Mellouki, F., Belgarrabe, A. & Blázquez, M. A., 2005, Chemical composition of the essential oils of Pistacia atlantica Desf, *Journal of Essential Oil Research*, 17(1), 52-

54.
Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M. & Chiralt, A., 2012, Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films, *Food Hydrocolloids*, 26(1), 9-16.
Burt, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
Cha, D. S., Choi, J. H., Chinnan, M. S. & Park, H. J., 2002, Antimicrobial films based on Na-alginate and κ-carrageenan, LWT-*Food Science and Technology*, 35(8), 715-719.
Coma, V., 2008, Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat based products, *Meat Science*, 78(1-2), 90-103.
Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., German, J. B., Ghanati, K. & Khaksar, R., 2015, Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing Zataria multiflora essential oil, *International journal of biological macromolecules*, 72, 606-613.
De Moura, M. R., Mattoso, L. H. & Zucolotto, V., 2012, Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging, *Journal of Food Engineering*, 109(3), 520-524.
Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K. & Dutta, J., 2009, Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, *Food chemistry*, 114(4), 1173-1182.
Fisher, K. & Phillips, C. A., 2006, The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in *vitro* and in food systems, *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1232-1240.
Garcı́a, M. A., Pinotti, A., Martino, M. N. & Zaritzky, N. E., 2004, Characterization of composite hydrocolloid films, *Carbohydrate Polymers*, 56(3), 339-345.
Ghalem, B. R. & Mohamed, B., 2009, Essential oil from gum of *Pistacia atlantica* Desf.: Screening of antimicrobial activity, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(1), 13-15.
Hatamnia, A. A., Abbaspour, N. & Darvishzadeh, R., 2014, Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica subsp. kurdica*) fruits, *Food chemistry*, 145, 306-311.
Hosseini, F., Adlgostar, A. & Sharifnia, F., 2013, Antibacterial activity of Pistacia atlantica extracts on *Streptococcus mutans* biofilm, *Int. Res. J. Biol. Sci*, 2(2), 1-7.
Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M. & Farahmandghavi, F., 2015, Bio-based composite edible films containing Origanumvulgare L. essential oil, *Industrial Crops and Products*, 67, 403-413.
Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A. & Koocheki, A., 2014, Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties, *Food Hydrocolloids*, 36, 9-19.
Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. & Hosseini, S. M. H., 2010, Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water, *Food Chemistry*, 122(1), 161-166.
Peng, Y. & Li, Y., 2014, Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films, *Food Hydrocolloids*, 36, 287-293.
Salmieri, S. & Lacroix, M., 2006, Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10205-10214.
Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A. & González-Martínez, C., 2010, Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on Penicillium italicum, *Carbohydrate polymers*, 82(2), 277-283.
Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. & Cháfer, M., 2009, Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil, *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2102-2109.
Shen, Z. & Kamdem, D. P., 2015, Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils, *International journal of biological macromolecules*, 74, 289-296.
Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S. M. & Khaksar, R., 2013, Characterization of antioxidant-antimicrobial κ-Carrageenan films containing satureja hortensis essential oil, *International journal of biological macromolecules*, 52, 116-124.
Tharanathan, R. N., 2003, Biodegradable films and composite coatings: past, present and future, *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71-78.
Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M. & Hashemi, M., 2014, The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran–whey protein by nanoparticle incorporation, *Carbohydrate polymers*, 109, 118-125.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 4, Oct- Nov 2017, p. 584-593

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 4، مهر - آبان 1396، ص. 593-584

Characterization of physical and antimicrobial properties of chitosan edible films containing *Pistacia atlantica* gum essence

V. Alizadeh[1], H. Barzegar[2*], B. Nasehi[3], V. Samavati[2]

Received: 2015.10.13
Accepted: 2016.02.15

Introduction: The environmental effect of synthetic plastic wastes is of increasing global concern. There is an urgent need to develop and apply renewable biopolymer materials. Development of edible and biodegradable films can help solving the waste disposal problem by partially replacing synthetic plastics (Martins *et al*., 2012). Chitosan; a linear polysaccharide composed of (1, 4)-linked 2-amino-deoxy-b-d-glucan, is a deacetylated (to varying degrees) product of chitin, which is the second most abundant polymer found in nature after cellulose. It has been proved to be biodegradable, biofunctional, biocompatible, nontoxic and have strong antifungal and antimicrobial properties (Aider, 2010). Thus, this work was undertaken to investigate the physical, optical, barrier, mechanical, microstructural, and antimicrobial properties of chitosan films incorporated with PEO, to examine its potential applications as a packaging material.

Materials & method: The films were prepared according to the solvent casting technique reported by (Abdollahi *et al.*, 2012) with some modifications. Tensile strenght (TS) and elongation at break (E) of the films were measured with texture analyzer according to Barzegar *et al*. (2014) method. Equilibrated film strips (at 53% RH for 48 h) were fixed between the grips with an initial separation of 50 mm and the cross-head speed was set at 50 mm/min. TS was calculated by dividing the maximum force by the initial area of the film and E% was calculated through dividing the extension at the moment of specimen rupture by the initial gauge length and multiplying by 100. The WVP of the films was determined at according to the Shojaee-Aliabadi et al. (2013). The test cups containing anhydrous calcium chloride (0% RH) were sealed by the test films, then were placed inside a desiccator containing sodium-chloride-saturated solution (75% RH). Weight gain of the cups along time were recorded periodically and plotted as a function of time. Antimicrobial properties of the films were assessed using the disc-diffusion method according to Dashipour *et al*. (2015). Four gram-positive or gram-negative bacteria, including *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* and *S. typhimurium* were used for testing.

Results and discussions: The influence of PEO incorporation on thickness, TS, EAB, WVP and water solubility of films can be seen in Table 1. The incorporation of PEO into the film-forming dispersion led to an increase in the thickness of the films, which varied between 0.131 mm and 0.185 mm. It could be due to the entrapment of PEO micro droplets by the polymer matrix (Dashipour *et al.* 2015). By increasing PEO concentration from 0.5 to 2 % in the film solutions, WS decreased markedly from 22.46 to 16.15 ($P < 0.05$). This behavior can be explained by the cross-linking effects of PEO components to esters and/or amide groups. Cross-linking in the chitosan film leads to a polymer with lower water solubility, which is useful when product integrity and water resistance are intended (Hosseini *et al*., 2009).

Table 1. Physical and mechanical properties of chitosan films.

PEO (% v/v)	Thickness (mm)	Solubility in water (%)	WVP ($g\ s^{-1} m^{-1} Pa^{-1} \times 10^{-10}$)	TS (MPa)	EAB (%)
0.0	0.131 ± 0.01^d	22.46 ± 0.73^a	1.04 ± 0.05^c	21.22 ± 1.97^a	49.05 ± 1.63^c
0.5	0.153 ± 0.01^c	21.19 ± 1.22^a	1.12 ± 0.06^c	20.09 ± 1.40^a	50.36 ± 2.98^c
1	0.167 ± 0.01^b	18.47 ± 0.53^b	1.35 ± 0.09^b	17.04 ± 1.26^b	55.25 ± 2.95^b
2	0.185 ± 0.01^a	16.15 ± 0.54^c	1.73 ± 0.09^a	13.23 ± 1.35^c	59.37 ± 2.49^a

The incorporation of PEO into chitosan-based films leads to an increase in WVP values from 1.04 to 1.73 $g\ s^{-1} m^{-1} Pa^{-1} \times 10^{-10}$. A similar trend has been found by Bonilla *et al*., (2011) in chitosan-based films incorporated

1, 2 and 3. MSc. Student, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Iran.
(Corresponding author email address: barzegarha@yahoo.com)

with thyme essential oil. The structural discontinuities induced in the polymer network by the addition of PEO could be the reason for the lowest resistance to breakage of the emulsified films. These discontinuities greatly reduced the film cohesion and mechanical resistance (Bonilla *et al.,* 2012). Conversely, the EAB value of the films increased significantly ($P < 0.05$) from 49.05% to 59.37%, because the essential oil acted as a plasticizer even at small concentrations and enhanced the flexibility of the polymer chains.

The effects of PEO on the antimicrobial properties of the chitosan films are shown in Table 2. The films containing 1% PEO showed a certain inhibitory effect against *B. cereus* and *S. aureus* but no inhibition against *S. typhimurium* and *E. coli*. As the concentration of PEO increased, the zone of inhibition also increased significantly ($P < 0.05$). The films containing 2% PEO were effective against all studied bacteria and a greater inhibitory power was observed on *S. aureus* with the zone area of 49.67 mm^2. The inhibitory effect of PEO is due to the two monoterpene hydrocarbons, α-pinene, and β-pinene (Barrero *et al*., 2005).

Table2. Antimicrobial activity of chitosan films.

PEO (% v/v)	**Inhibition zone (mm^2)**			
	S. aureus	***B. cereus***	***E. coli***	***S. typhimurium***
0.0	0.00^c	0.00^c	0.00^b	0.00^b
0.5	0.00^c	0.00^c	0.00^b	0.00^b
1	22.58 ± 1.76^b	15.63 ± 0.63^b	0.00^b	0.00^b
2	49.67 ± 3.02^a	41.96 ± 1.40^a	21.12 ± 1.87^a	12.49 ± 1.57^a

Conclusion: The results obtained in this study showed that the chitosan films incorporated with PEO has a good potential to being empolyed as an active film to preserve food products. Addition of PEO decreased water solubility and tensile strength, while increased the thickness, WVP and percent elongation of the films. Overall, this study demonstrates that PEO-containing films present a good potential for their application in the food industry.

Keywords: Chitosan, *Pistacia atlantica* gum essential oil, Antimicrobial activity.